

RESULTATS

Resultats

I. Determinació del període del desenvolupament murí en el que la T_3 permet la resposta cortical dependent d'andrògens del gen del KAP

Els resultats *in vivo* obtinguts fins al moment, en el nostre laboratori, suggereixen que tant la GH com la TH estan condicionant la resposta cortical deguda a andrògens del gen del KAP en les cèl.lules S_1/S_2 renals i que la falta d'ambdues hormones en algun moment del desenvolupament postnatal, és determinant de la falta d'expressió cortical en el ratolí adult.

I.a. Efecte de T_3 i GH en la resposta cortical del gen del KAP en ratolins C57BL/6 amb hipotiroïdisme postnatal

Un dels nostres objectius ha estat determinar quin és el període crític postnatal en el que és imprescindible la presència de T_3 i GH perquè el gen del KAP s'expressi en el córtex renal. Amb aquesta finalitat, es van utilitzar animals amb hipotiroïdisme induït per ingestió de $KClO_4$ 1% (112), des del dia del naixement fins al dia del sacrifici (dia 40 postnatal) i se'ls va administrar TH i/o GH entre els dies 7 i 21 postnatal. Aquest interval de temps es va escollir en base a que s'ha descrit que la falta de TH i GH afecta al desenvolupament renal a partir del dia 10 de vida (137) i que en la segona setmana després del naixement, els nivells plasmàtics de T_4 mostren un pic i comença en els ratolins, el creixement puberal. Tomita *et al*

(138), postulen que l'augment transitori de les concentracions sèriques de T_4 , desencadena un creixement somàtic ràpid i canvis metabòlics durant la pubertat, en el ratolí, almenys en part a través de l'estimulació de les cèl·lules pituïtàries productores de GH. El mecanisme depenent de l'edat, a través del que canvia la capacitat de resposta de la glàndula tiroïdal a TSH, no es coneix. S'ha descrit, que l'hipotiroïdisme sever retarda el creixement puberal, encara que no disminueix els nivells de testosterona en mascles (resultats no mostrats). Mitjançant el nostre model d'hipotiroïdisme, es volia determinar si la interrupció de les pautes hormonals programades en el desenvolupament murí eren la causa de la manca d'expressió del mRNA del gen del KAP en el córtex renal, a més d'intentar revertir aquest efecte a través de l'administració de T_3 i/o GH en animals amb hipotiroïdisme farmacològic postnatal. Per tal de comprobar si la retirada del $KClO_4$ 1% en dies concrets del desenvolupament postnatal, i per tant l'assoliment de nivells fisiològics de T_3 , era equivalent a l'administració simultània de $KClO_4$ 1% i T_3 en el mateix període de temps, a un grup d'animals se'ls va substituir el $KClO_4$ 1% per aigua, durant els dies 7 i 21 postnats, fet que permet desbloquejar les bombes de iode de les cèl·lules de la glàndula tiroïdal de l'animal i en conseqüència, facilitar la síntesi de T_3 , durant aquests dies, ja que el $KClO_4$ 1% ingerit per la mare és transmès a les cries a través de la llet.

Els resultats de l'anàlisi mitjançant hibridació *in situ* de seccions de ronyó dels animals sacrificats als 40 dies de vida postnatal, són els representats en la figura 1.

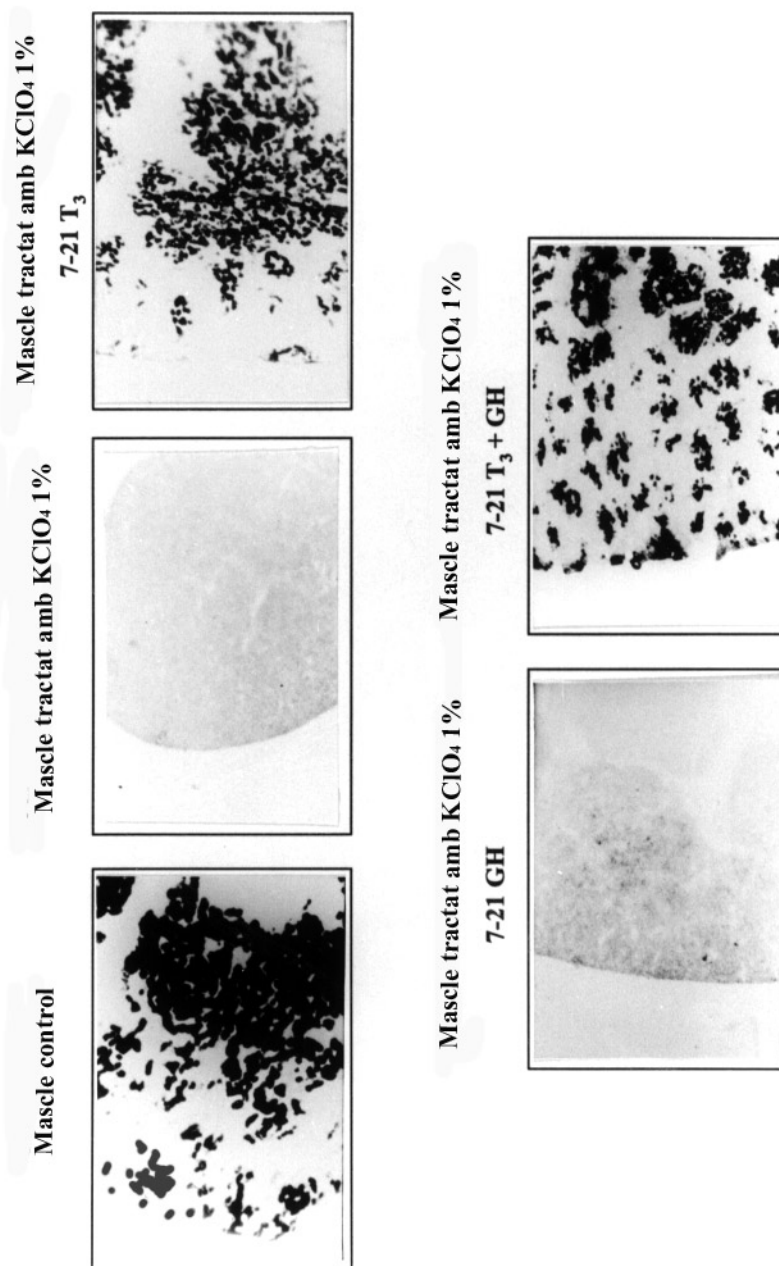


Fig 1. Efecte de la T_3 i GH en l'expressió cortical del gen del KAP en ratolins mascles tractats amb "goitrogen". Seccions de ronyó de ratolins mascles C57BL/6 control, tractats amb KClO_4 1% des del naixament fins al final de l'experiment, amb l'administració simultània de T_3 , GH o T_3 i GH, diàriament per injecció subcutània, des del dia 7 al 21 postnatal, o amb la substitució del KClO_4 1 % per aigua durant aquest mateix període, van ser hibridades *in situ* amb sondes de cRNA marcades amb ^{35}S .

La presència puntual de T_3 i, no de GH, permet l'expressió cortical mitjançada per andrògens del gen del KAP en l'animal adult, encara que la combinació d'ambdues hormones potencia l'efecte produït per T_3 .

La resposta produïda per l'administració de T_3 , des del dia 7 al dia 21 postnatal, a animals exposats a $KClO_4$ 1%, és igual a l'observada pel grup en el que es va substituir el $KClO_4$ 1% per H_2O durant el mateix període. Per tant, es demostra que els efectes de la T_3 endògena són equivalents a l'administració de T_3 a animals hipotiroïdals i que, conseqüentment, l'acció observada és deguda a T_3 . També, es va poder comprovar que encara que l'acció puntual de T_3 recupera el senyal cortical de KAP, la mida i el pes de l'animal augmenten significativament respecte el dels animals amb hipotiroïdisme farmacològic durant tot el seu desenvolupament postnatal, però, no s'aconsegueix el tamany d'un ratolí normal control.

Tot això, podria indicar una gran sensibilitat del gen del KAP per T_3 i GH i, alhora, implicar-lo en un punt important del desenvolupament.

A continuació es presenten els tamanyos en grams (g) dels quatre grups mencionats en forma de taula, podent comparar d'aquesta manera, la presència de senyal cortical de KAP (Fig.1) i la grandària de l'animal (Taula.1).

Grup1: control;

Grup 2: $KClO_4$ 1% control;

Grup 3: 1,2 μ g/dia T_3 7-21 d;

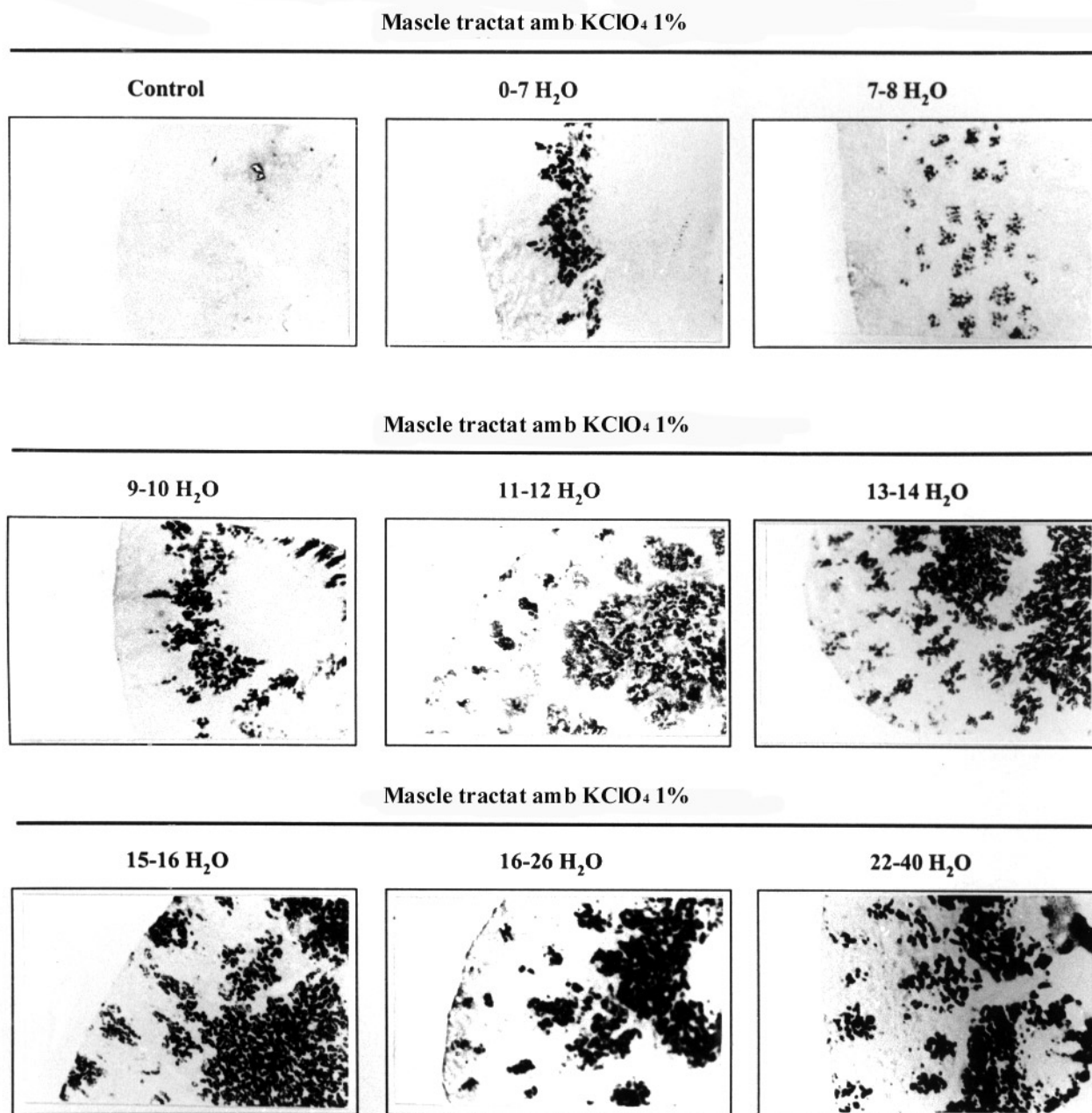
Grup 4: H_2O 7-21 d.

	sexe	Pes (g)
Grup 1	Mascle	19,7 ± 0,1
Grup 2	Mascle	8 ± 0,05
Grup 3	Mascle	13,3 ± 0,1
Grup 4	Mascle	13,98 ± 0,1

*Taula 1. Determinació del pes de ratolins C57BL/6 hipotiroïdals. Els valors de pes en grams van ser analitzats per la seva significativitat estadística per Students *t*-test i va ser considerada com a significant $p=0,05$. Valors ± S.E.M.*

Per poder determinar amb més precisió el període crític en el que T_3 intervé per facilitar la resposta cortical androgènica de KAP, es van dissenyar nous experiments amb grups d'animals hipotiroïdals, en els que s'acoten els períodes d'exposició a TH. Es va triar un període arbitrari de 48 h d'exposició a TH, des del dia 7 al dia 16, amb la intenció d'observar si realment els efectes de T_3 es manifestaven en l'etapa de la pubertat d'un animal normal. No obstant, degut a que era possible que no poguessim reestablir la mateixa resposta a TH que la que es pot detectar en un animal eutiroïdal, es van incloure tres grups (grup número 2, 8 i 9) que flanquejaven el període abans esmentat, i a fi de validar si el temps d'exposició a TH de 48 h era suficient per permetre l'activació del gen del KAP en els segments corticals, es va ampliar el temps en el que es permetia beure aigua enlloc de $KClO_4$ 1%. (Fig.2).

Els resultats obtinguts de la hibridació *in situ* de seccions de ronyó dels animals sacrificats als 40 dies de vida postnatal, es recullen en la figura 2.



Mascle control no tractat



Fig 2. Efecte de la T_3 durant diferents etapes del desenvolupament postnatal de ratolins C57BL/6 amb hipotiroïdisme farmacològic. L'hipotiroïdisme congènit va ser induït per l'administració de $KClO_4$ 1% en l'aigua de beguda, des del naixement de les cries fins al final de l'experiment, exceptuant els dies en els que es substituïa per H_2O . Ratolins mascles C57BL/6 control i hipotiroïdals van ser utilitzats com a controls del tractament. Es va utilitzar la tècnica de la hibridació *in situ* de seccions de ronyó, com s'ha descrit anteriorment.

La T_3 , des del naixement fins al dia 10 postnatal, no té cap efecte sobre l'expressió cortical de KAP, però sí que en té a partir del dia 11 i augmenta a mesura que s'aproximen els dies 15 i 16 postnats. És a dir, la presència de T_3 en la segona setmana de vida, que coincideix amb l'inici de la pubertat en un animal eutiroidal, permetria recuperar el senyal cortical depenent d'andrògens del gen del KAP, en l'animal hipotiroïdal adult. Els grups número 8 i 9 també presenten senyal cortical i, per tant, podem postular que la transactivació del gen del KAP pot desencadenar-se per l'acció puntual de T_3 a partir del dia 11 postnatal, en ratolins mascles.

I.b. Diferències en l'expressió cortical mitjançada per T_3 en ratolins mascles i femelles C57BL/6

S'ha comprovat que l'efecte perpetuador de l'acció de la T_3 sobre l'expressió cortical del gen del KAP, depèn de l'estat androgènic de l'animal. Aquesta observació es corrobora pel fet que en ratolins femella de la mateixa soca, la T_3 no hi té cap efecte (Fig.3).

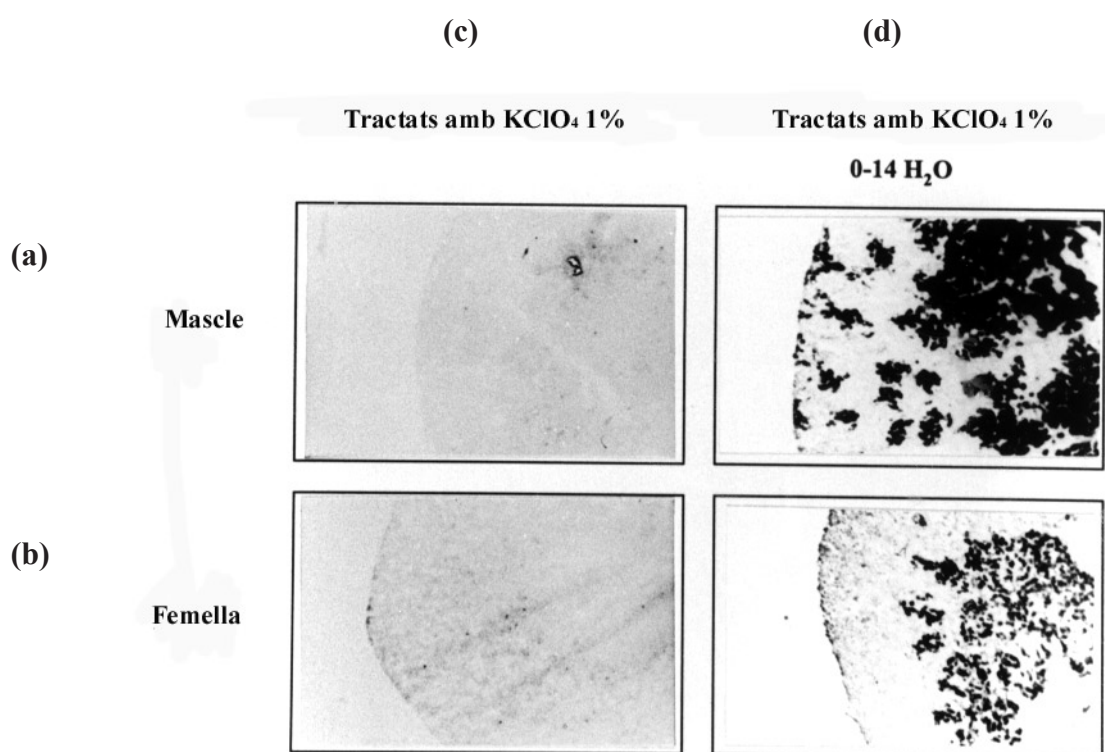


Fig 3. Expressió cortical del gen del KAP en ratolins mascles i femelles C57BL/6. Seccions de ronyó congelades d'animals mascle hipotiroïdals adults (a) i femelles (b), i ratolins mascles i femelles exposats a $KClO_4$ 1 % des del dia 15 postnatal fins al moment del sacrifici (c, d), van ser hibridats *in situ* amb les sondes de cRNA de KAP i els resultats comparats entre els diferents grups (a, c respecte b, d).

II. Estudi de la relació entre l'hormona tiroïdal, les C/EBPs i l'expressió del gen del KAP en el ronyó murí durant el desenvolupament postnatal

En el desenvolupament postnatal, es produeix un pic fisiològic de T_3 que és de gran importància per diferents òrgans, un dels quals és el ronyó. Com a exemples es poden citar; la importància d'aquest pic hormonal per alguns enzims oxidatius mitocondrials en cèl·lules del túbul contornejat proximal renal (PCT) (139), o a l'inversa, que l'hipotiroïdisme afecta l'expressió gènica a nivell postraducciona l en el ronyó, com s'ha observat, per exemple, per MCAD (*Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*) (140) i ACE (*Angiotensin I-Converting Enzyme*) (141).

L'hipotiroïdisme congènit provoca una devallada significativa en l'expressió de C/EBP α i C/EBP β en els estadis primerencs del desenvolupament postnatal hepàtic de rata (129). També, es coneixen alguns dels efectes d'aquesta família de factors de transcripció en el ronyó; intervenen en la regulació transcripcional del gen de la PEPCK (*Phosphoenolpyruvat Carboxykinase*) (142), important enzim gluconeogènic; els nivells renals de C/EBPs es troben alterats en la *Diabetis Mellitus* experimental (143); i algun membre (Gadd153/CHOP) és induït per *stress* oxidatiu associat a l'urea (144). Per tot això, ens va interessar estudiar els nivells de C/EBP α i C/EBP β , juntament amb els de KAP, en diferents models renals murins, per tal d'analitzar l'existència d'alguna correlació entre ells.